ARCHIVIO

PER LE

SCIENZE MEDICHE

PUBBLICATO DA

G. BIZZOZERO (Torino) — C. BOZZOLO (Torino) — P. FOÀ (Torino)
C. GIACOMINI (Torino) — C. GOLGI (Pavia) — L. GRIFFINI (Genova)
N. MANFREDI (Pisa) — E. MARCHIAFAVA (Roma) — A. MOSSO (Torino)
L. PAGLIANI (Roma) — E. PERRONCITO (Torino) — E. SERTOLI (Milano)
C. TARUFFI (Bologna) — G. TIZZONI (Bologna)

E DIRETTO DA

G. BIZZOZERO

Estratto

TORINO E PALERMO
CARLO CLAUSEN

FIRENZE - ERMANNO LOESCHER - ROMA

1893

ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE. — Vol. XVIII. N. 11.

Istituto di Patologia generale della R. Università di Torino,
diretto dal Prof. G. Bizzozero.

INFLUENZA DELL'AUMENTO DELLA MASSA SANGUIGNA

SUL

POTERE EMATOPOIETICO DEL MIDOLLO OSSEO

STUDIO SPERIMENTALE

DEL DOTTOR

Giuseppe REBUSTELLO

Dalle ricerche di Bizzozero e Neumann e dalle osservazioni concordi di molti altri osservatori, risulta come la produzione dei globuli rossi nei mammiferi, abbia luogo durante la vita estrauterina *per attività del midollo rosso delle ossa, ove i globuli rossi nucleati attivamente si moltiplicano per scissione indiretta.*

Venne anche accertato che la produzione dei globuli rossi vi aumenta notevolmente quando si sottoponga l'animale da esperimento a ripetuti salassi.

Ora qual è invece l'influenza della condizione opposta? *Qual è sulla funzione ematopoietica del midollo l'influenza dell'aumento dei globuli rossi circolanti?*

Non è a mia conoscenza che da alcuno il quesito sia stato risolto. Perciò, dietro consiglio e colla guida del Prof. Bizzozero, ho intrapresa una serie d'esperimenti in proposito,

iniettando nell'animale una variabile quantità di sangue omogeneo ed esaminando poscia il midollo delle ossa.

Per compire questo studio ho scelto le cavie ed i cani giovani, giacchè nei giovani animali il potere ematopoietico del midollo osseo è molto attivo. Inoltre in questi animali giovani si può avere un' ulteriore controllo nella milza. Nella milza di questi animali, infatti, perdura il potere ematopoietico, come osservò Kölliker e confermarono Bizzozero e Salvioli; mentre di regola generale, secondo i due ultimi, ed io lo posso confermare, nei cani adulti è sospeso.

Per aumentare la massa sanguigna dell'animale in esperimento, toglievo da altri animali della stessa specie la quantità di sangue che volevo iniettare. Da un'arteria, usando le cautele antisettiche e previamente sterilizzando strumenti e vasi, raccoglievo il sangue in un recipiente tiepido nel quale lo defibrinavo collo sbattimento, e, dopo filtrato attraverso un pannolino, con una grossa siringa lo iniettavo nel cavo peritoneale dell'animale in esperimento.

Ho prescelto la trasfusione intraperitoneale suggerita da Panfick, perchè con essa si hanno ottimi risultati, come dimostrarono Bizzozero e Golgi; è più facile e spiccia e si evitano i possibili accidenti delle trasfusioni endovenose.

Gli animali sopportano assai bene questa operazione anche praticata parecchie volte; in una cavia, per esempio, la praticai sei volte nel periodo di venticinque giorni senza riscontrare poi all'autopsia alterazione alcuna nel peritoneo.

La quantità di sangue che iniettavo in ciascuna volta, calcolata in peso, variava da un terzo della massa sanguigna dell'animale sottoposto all'esperimento fino ad uguagliarla e, nelle cavie, sorpassandola anche d'una metà.

Per esaminare il midollo osseo e la milza seguii il metodo indicato dal Bizzozero, la dilacerazione, cioè, d'un pezzetto di tessuto, appena tolto dall'animale, in una soluzione di cloruro sodico al 0,60 % o in questa stessa soluzione coll'aggiunta di alcune gocce di una soluzione di metilvioletto, in modo da ottenere una tinta azzurro-cielo.

Fissai anche i tessuti in sublimato, e, fattane inclusione in paraffina e sezionati, li esaminai colorandoli con varie miscele: miscela cosidetta triacida d'Ehrlich, eosina ed azzurro di metilene, ematossilina ed acido picrico.

La miscela Ehrlich per la sua facile alterabilità e per la difficoltà di ottenere buone colorazioni è poco raccomandabile, quantunque qualche volta dia risultati soddisfacenti. La eosina e l'azzurro di metilene lasciano spesso incerti, colorando l'eosina in rosso anche i leucociti e non differenziando quindi i globuli rossi nucleati. Migliori risultati ottenni dall'ematossilina ed acido picrico, conformemente a quanto ottenne già Bizzozero.

Per ottenere evidenti i globuli rossi nucleati o constatarne la presenza è ottimo, infine, il metodo proposto da Foà: Fissazione dei tessuti in acido osmico all'1 per $^0/_0$ in una soluzione fisiologica di cloruro di sodio, colorazione in azzurro di metilene con olio di anilina o semplice, decolorazione in acido cromico 1 $^0/_0$. In ogni modo, per altro, il metodo da me preferito e sul quale basai lo studio, fu l'esame a fresco dei tessuti, perchè solo con questo si possono ottenere risultati sicuri.

Prima d'intraprendere lo studio sulle cavie esaminai il midollo osseo delle coste e del femore di parecchi individui allo stato fisiologico e di varia età. Siccome i miei esperimenti di trasfusione vennero fatti su cavie di tre mesi circa, credo opportuno di premettere in uno specchietto il reperto istologico dell'esame fatto in un animale di questa età, sano ed in nessun modo operato.

Cavia sana di mesi tre.

Midollo osseo costale. — Numerosissimi i globuli rossi nucleati ed in mitosi. — Nessuna cellula globulifera nè pigmentifera.

Midollo osseo femorale. — Numerosissimi i globuli rossi nucleati e le loro mitosi nei varî stadî. — Nessuna cellula globulifera nè pigmentifera.

Milza. — In discreta quantità i globuli rossi nucleati, taluno in mitosi. — Cellule globulifere non molte, più numerose le pigmentifere.

Da questo reperto si rileva che *nelle giovani cavie il potere ematopoietico è assai attivo nel midollo osseo e perdura, meno attivo, anche nella milza*, e che la distruzione dei globuli rossi vecchi avviene nella milza.

Ciò premesso, vediamo quali siano in questi organi le modificazioni apportate dall'aumento della massa sanguigna. Per brevità non riferirò i particolari dell'esperimento, e riporterò solo i reperti istologici di due dei cinque esperimenti fatti su questi animali, riassumendo poscia il risultato generale.

Esperimento *del* 15 *Gennaio* 1894.

Cavia di mesi tre circa, sana. Peso del corpo di grm. 300, massa sanguigna circa grm. 12.

Nel periodo di 25 giorni si praticano cinque iniezioni intraperitoneali di sangue nella complessiva quantità di grm. 50.

Ucciso l'animale, si ha il reperto seguente, esaminando i tessuti a fresco col metodo sopra esposto.

Midollo osseo costale. — *Assenti le emazie nucleate.* — Cellule globulifere numerose. — Cellule pigmentifere rare.

Midollo osseo femorale. — *Assenti le emazie nucleate.* — Cellule globulifere e pigmentifere rare.

Milza. — *Assenti le emazie nucleate.* — Numerosissime cellule pigmentifere. — Assai numerose le cellule globulifere.

Esperimento *del* 30 *Gennaio* 1894.

Cavia di mesi tre circa. Peso del corpo grm. 290, massa sanguigna grm. 12 circa. Nel periodo di 11 giorni si iniettano nel peritoneo grm. 60 di sangue in quattro volte. Ucciso l'animale, si esamina il midollo osseo e milza col solito metodo.

Midollo osseo costale. — *Rarissimi i globuli rossi nucleati, nessuna mitosi.* — Assai rare le cellule globulifere e pigmentifere.

Midollo osseo femorale. — *Oltremodo rari i globuli rossi nucleati, rarissime le mitosi.* — Nessuna cellula globulifera e pigmentifera.

Milza. — *Assenti i globuli rossi nucleati.* — Numerose le cellule globulifere. — Oltremodo numerose le pigmentifere.

Ponendo a confronto questi due reperti con quello della cavia in condizioni fisiologiche evidente risulta la differenza. I risultati degli altri tre esperimenti furono costantemente uguali.

Posso perciò affermare che la funzione ematopoietica la quale nelle giovani cavie è assai attiva nel midollo delle ossa e perdura tuttora nella milza, in conseguenza di trasfusioni sanguigne, *viene diminuita notevolmente e fatta cessare nel midollo, costantemente abolita nella milza.* Compaiono inoltre nel midollo delle ossa cellule globulifere e pigmentifere.

L'esame degli organi anzidetti fissati, inclusi e colorati, come sopra ho esposto, hanno confermato il reperto dell'esame a fresco.

Come per le cavie, anche pei cani ho preventivamente esaminato il midollo osseo costale, femorale (epifisi e diafisi) e milza di individui sani e giovani e ne riproduco il reperto.

Cane giovane sano.

Midollo osseo costale. — Numerosi i globuli rossi nucleati e le loro mitosi. — Non molte cellule pigmentifere, taluna con uno o più globuli rossi, qualche rarissima globulifera.

Midollo osseo femorale. — In numero discreto i globuli rossi nucleati e le loro mitosi. — Rare cellule pigmentifere contenenti qualche globulo rosso.

Milza. — Rari i globuli rossi nucleati, taluno in mitosi. — Numerose assai le cellule pigmentifere. — Qualche globulifera.

Seguendo poi lo stesso processo adoperato per le cavie, aumentai la massa sanguigna in cagnolini dell'età da tre a cinque mesi.

Basterà che io riporti un solo reperto istologico dei tre esperimenti eseguiti sui cani, essendo uguali fra loro ed avendo ottenuti risultati identici a quelli delle cavie.

Esperimento 25 *Marzo* 1894.

Midollo osseo costale. — *Rarissimi i globuli rossi nucleati e le loro mitosi.* — Non molte le cellule pigmentifere, taluna con qualche globulo rosso, in numero discreto le cellule globulifere.

Midollo osseo femorale. — *Oltremodo rari i globuli rossi nucleati e di questi rarissime le mitosi.* — Numerosissime cellule pigmentifere e globulifere.

Milza. — *Assenti i globuli rossi nucleati.* — Assenti le cellule globulifere. — Scarse le cellule pigmentifere.

Da quanto ho riferito si può facilmente rilevare che ne' miei esperimenti, sia nelle cavie che nei cani i risultati furono costantemente concordi, posso perciò concludere che *la pletora globulare diminuisce notevolmente e può talora far cessare la produzione dei globuli rossi.*

Per ottenere nei cani un alto grado di pletora globulare ho praticate le iniezioni di sangue sempre ad intervalli di tempo brevi, e per accertarne il grado ho fatto l'esame del sangue dell'animale col cromocitometro di Bizzozero.

Con questi esami mi sono convinto che essa aumenta fino ad un certo grado col succedersi delle iniezioni sanguigne, e che non lo oltrepassa anche se si ripetono le iniezioni. In un cane che prima dell'esperimento aveva un grado citometrico uguale a 105,7 di emoglobina, ventiquattro ore dopo la prima iniezione trovai nel sangue una quantità di emoglobina uguale a 137,5. Continuando le iniezioni, negli ultimi giorni prima di ucciderlo, il sangue aveva un grado di emoglobina uguale a 220 che rimase costante ad onta di nuove iniezioni. Da questi risultati si può facilmente comprendere che il grado citometrico del sangue può essere raddoppiato e mantenuto costante a mezzo di ripetute iniezioni di sangue omogeneo ottenendo così una vera pletora globulare.

Dagli esperimenti sulle cavie ho potuto trarre un'altra conclusione che si può rilevare anche dall'osservazione dei due reperti riferiti su questi animali. Infatti vi si vede che in due animali che avevano la stessa quantità di sangue, nel primo furono iniettati grm. 50 di sangue nel periodo di 25 giorni, nel secondo grm. 60 in 11 giorni. Nel primo si ebbe la completa scomparsa dei globuli rossi nucleati dal midollo delle ossa, nel secondo solo una notevole diminuzione di questi elementi rigeneratori del sangue. Ciò dimostra che l'azione della

pletora globulare sul potere ematopoietico del midollo delle ossa, qualora il grado sia uguale è in rapporto proporzionale al tempo pel quale viene mantenuta la pletora globulare.

Nello specchietto dell'esame istologico del midollo osseo dei giovani cani in istato fisiologico, ho notata la presenza di di cellule globulifere contrariamente a quanto affermano Neumann, e recentemente Freiberg, i quali dicono di non averle *mai osservate* nel midollo osseo dei mammiferi in condizioni fisiologiche.

Ho esaminati numerosi midolli ossei di cani sani di varia età e pressochè costantemente trovai la presenza di cellule globulifere, conformemente a quanto ha osservato Bizzozero, il quale su sedici cani esaminati le riscontrò in dodici. Neumann crede che gli osservatori che affermano un tale fatto possano aver presi come globuli rossi i grossi granuli di pigmento.

Dalle mie osservazioni posso affermare che esistono nel midollo osseo dei cani sani, anche giovani, vere cellule globulifere. Le cellule esclusivamente globulifere sono rare, mentre invece predominano le forme miste, vale a dire cellule con uno, due o più globuli rossi e pigmento a piccoli e medi granuli.

Per poter affermare con sicurezza il fatto sono ricorso ad un espediente che riferisco, essendo convinto che la reazione del ferrocianuro di potassio, che il Freiberg, nel suo lavoro sulla rigenerazione dei corpuscoli rossi nel midollo osseo, accenna quale mezzo per distinguere il pigmento dai globuli rossi, è insufficiente allo scopo pel quale veniva proposta, giacchè è noto che questa reazione non avviene in tutti gli stadi di passaggio che subisce il pigmento.

Lo spediente al quale ricorsi per potermi convincere della presenza nelle cellule di globuli rossi, si basa sul fatto che le soluzioni concentrate di cloruro sodico rendono moriformi i globuli rossi del sangue e che successivamente si possono far

ridistendere, attenuando la soluzione mediante una goccia d'acqua. Ecco in breve l'esperimento:

In una goccia d'una soluzione di cloruro sodico all'1 % dilacero un pezzetto del midollo osseo in esame. Ricoperto il preparato con un vetrino, lo esamino con una buona lente ad immersione ad acqua. Dopo qualche minuto i globuli rossi appaiono moriformi e cercando qualche cellula globulifera se ne trova taluna contenente i globuli rossi moriformi, tal'altra globuli ancora distesi. Tenendo sott'occhio questa si vedono a raggrinzarsi. Aggiungo allora una goccia d'acqua. Calmate le correnti prodotte dal penetrare dell'acqua, si vedono distesi i globuli rossi liberi. I globuli rossi in qualche globulifera sono distesi, in qualche altra sono ancora moriformi. Bene osservando queste ultime si vedono non libere ma immerse in in un po' di sostanza fondamentale gelatinosa del midollo, la quale ha ritardato l'effetto della diluzione della soluzione. Fissando allora una di queste cellule si può tener dietro, coll'occhio al microscopio, al graduale passaggio dei globuli rossi dallo stato moriforme a quello di distensione.

In questo modo ho ottenuta la dimostrazione della reale esistenza di cellule contenenti globuli rossi soli od associati a granuli di pigmento.

Ho sopra notato come nel midollo delle ossa dei cani in condizioni fisiologiche è più frequente riscontrare cellule pigmentifere con uno, due o più globuli rossi che cellule esclusivamente globulifere. Credo perciò che usando una lente debole possano passare inosservati i globuli rossi in esse contenuti, e si possa attribuire ad un tale errore d'esame il non averli *mai* riscontrati nel midollo sano di questi animali.

Nel corso di questo studio potei osservare un altro fatto che in parte si può rilevare dagli specchietti riportati. Notai cioè che la frequenza delle cellule globulifere e pigmentifere nella milza è in ragione inversa della loro frequenza nel midollo delle ossa. Ne consegue da ciò che il midollo osseo oltrechè avere il potere ematopoietico, in date circostanze può funzionare da organo distruttore dei globuli rossi coadiuvando così la milza.

Questo mio asserto può essere convalidato dalle osservazioni di Freiberg, il quale notò che negli animali smilzati il midollo osseo funziona per breve tempo da distruttore dei globuli rossi vecchi.

Ora riassumendo in brevi linee i fatti ricavati dalle mie esperienze, posso esporre queste conclusioni:

1° *La pletora globulare diminuisce notevolmente e può anche sospendere nel midollo la produzione dei globuli rossi.*

2° Nella milza, ancora dotata di potere ematopoietico, la pletora globulare lo sospende costantemente.

3° L'azione della pletora (dato eguale il grado di questa) sul potere ematopoietico del midollo delle ossa è in rapporto diretto alla durata di essa.

4° Nelle cavie il midollo delle ossa, oltre al possedere il potere ematopoietico, in date condizioni può funzionare come distruttore dei globuli rossi, cooperando in questa funzione colla milza. Nel midollo osseo dei cani questa funzione di distruggere i globuli rossi è pressochè costante anche in condizioni normali.

Prima di chiudere questo lavoro, sento il dovere di esprimere la mia profonda riconoscenza al Prof. Bizzozero per i suoi preziosi consigli e per i mezzi di lavoro che tanto largamente mi fornì nel suo istituto.

BIBLIOGRAFIA.

Bizzozero, « Sulla funzione ematopoietica del midollo delle ossa » (*Morgagni*, 1869).

Bizzozero e Salvioli, « Ricerche sulla ematopoiesi splenica » (*Arch. Sc. Med.*, vol. IV, pag. 59).

Bizzozero e Golgi, « Della trasfusione di sangue nel peritoneo, ecc. » (*Arch. Sc. med.*, vol. IV, n. 3, pag. 67).

Bizzozero e Torre, « Sulla produzione dei globuli rossi nelle varie classi dei vertebrati » (*Arch. sc. med.*, vol. VII, n. 24).

Kölliker, « Microscop. Anat. », Bd. II, 1854.

Freiberg, « Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration der Blutkörperchen im Knochenmark ». Dorpart, Schnakenburg's Buchdruckerei, 1892.

G. Bizzozero, *Direttore Responsabile.*

Torino. — Tipografia Vincenzo Bona.